

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

EP 00/5006

09/980177



REC'D 21 JUL 2000

WIPO

PCT

E 3 U

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 25 199.1

Anmeldetag: 01. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: MediGene Aktiengesellschaft,
Planegg/DE

Bezeichnung: Zytotoxische T-Zellepitope des Papillomavirus
L1-Proteins und ihre Verwendung in Diagnostik
und Therapie

IPC: C 07 K, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 23. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hof

5 **Zytotoxische T-Zellepitope des Papillomavirus L1-Proteins und ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Papillomavirus T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYL, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, und/oder eine funktionell aktive Variante davon, sowie ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie.

Die Papillomviren, auch Warzenviren genannt, sind doppelsträngige DNA-Viren mit einer Genomgröße von etwa 8000 Basenpaaren und einem Ikosaeder-förmigen Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 55 nm. Bis heute sind mehr als 100 verschiedene humanpathogene Papillomavirustypen (HPV) bekannt, von denen einige, z.B. HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-39, HPV-45, HPV-52 oder HPV-58, bösartige Tumore und andere, z.B. HPV-6, HPV-11 oder HPV-42 gutartige Tumore verursachen können.

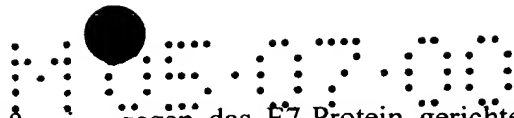
Das Genom der Papillomaviren läßt sich in drei Bereiche unterteilen: Der erste Bereich betrifft eine nicht-kodierende Region, die Regulationselemente für die Transkription und Replikation des Virus enthält. Die zweite Region, sogenannte E-(Early)Region enthält verschiedene Protein-kodierende Abschnitte E1-E7, von denen z.B. das E6- und das E7-Protein für die Transformation von Epithelzellen verantwortlich sind und das E1-Protein die DNA-Kopienzahl kontrolliert. Bei der E6- und E7-Region handelt es sich um sogenannte Onkogene, die auch in bösartig entarteten Zellen exprimiert werden. Die dritte Region, auch L-(Late)Region genannt, enthält zwei Protein-kodierende Abschnitte L1 und L2, die für Strukturkomponenten des Viruskapsids kodieren. Das L1-Protein ist zu über 90% im viralen Kapsid vorhanden, wobei das Verhältnis von L1:L2 im allgemeinen 30:1 ist. Unter dem Begriff L1-Protein versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung das Hauptkapsid Protein der Papillomaviren (Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445).

In über 50% der Fälle wird HPV-16 mit Gebärmutterhalskrebs (Cervixcarcinom) in Verbindung gebracht. HPV-16 ist der Hauptrisikofaktor für die Ausbildung von cervicalen

Neoplasien. Das Immunsystem spielt eine wichtige Rolle beim Fortschreiten der Krankheit. So sind vermutlich zelluläre Immunantworten und insbesondere Antigen-spezifische T-Lymphozyten wichtig für den Abwehrmechanismus. Es wurde weiterhin gefunden, daß in hochgradig malignen cervicalen intraepithelialen Neoplasien (CIN II/III) und cervicalen Tumoren das E7-Gen konstitutiv in allen Schichten des infizierten Epithels exprimiert wird. Daher wird vor allem das E7-Protein als potentieller Tumorantigen und als Zielmolekül für aktivierte T-Zellen betrachtet (siehe z.B. WO 93/20844). Die E7-induzierte zelluläre Immunantwort im Patienten ist aber anscheinend nicht stark genug, um den Krankheitsverlauf zu beeinflussen. Die Immunantwort kann eventuell durch geeignete Impfstoffe verstärkt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression des L1-Gens bzw. die Coexpression des L1- und L2-Gens zur Bildung von Capsomeren, stabilen Capsomeren, Capsiden oder Virus-ähnliche Partikel (VLPs für virus-like particle) führen kann (siehe z.B. WO 93/02184, WO 94/20137 oder WO 94/05792). Unter Capsomeren versteht man eine oligomere Konfiguration, die aus fünf L1-Proteinen aufgebaut ist. Das Capsomer ist der Grundbaustein, aus denen virale Capside aufgebaut sind. Unter stabilen Capsomeren versteht man Capsomere, die nicht dazu in der Lage sind sich zu Capsiden zusammenzusetzen. Unter Capsiden versteht man die Hülle des Papillomavirus, die beispielsweise aus 72 Capsomeren zusammengesetzt ist (Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445). Unter VLP versteht man ein Capsid, das morphologisch und in seiner Antigenität einem intakten Virus gleicht. Die VLPs konnten zur Auslösung einer humoralen Immunantwort, die durch Bildung von neutralisierenden Antikörpern charakterisiert ist, in verschiedenen tierischen Systemen verwendet werden. Die Bildung von virus-neutralisierenden Antikörpern gegen L1- und/oder L2-Protein ist jedoch von geringerer klinischer Bedeutung, wenn die Virusinfektion bereits stattgefunden hat, da für die Eliminierung virus-infizierter Zellen keine Antikörper, sondern eine virus-spezifische zytotoxische T-Zell-(CTL)-Antwort notwendig zu sein scheint. Und obwohl VLPs in der Lage sind eine zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen, scheint eine ausschließlich gegen die Kapsidproteine L1 und/oder L2 gerichtete Immunantwort nicht zur Bekämpfung eines durch Papillomaviren bedingten Tumors geeignet.

Es wurden daher sogenannte chimäre Papillomavirus-ähnliche Partikel (CVLPs für chimeric virus-like particle) entwickelt, die aus einem Fusionsprotein des Kapsidproteins L1 und des potentiellen Tumorantigen E7 bestehen (WO 96/11272 und Müller, M. et al. (1997) Virology,



234, 93). Die CVLPs lösten nur im geringen Maße eine gegen das E7-Protein gerichtete humorale Immunantwort aus (Müller, M. et al. (1997), supra). Einige der getesteten CVLPs induzieren jedoch tatsächlich die erwünschte E7-spezifische zytotoxische T-Zellantwort in Mäusen (siehe auch Peng S. et al. (1998) Virology 240,147-57). CVLPs sind deshalb sowohl für die Entwicklung eines Impfstoffes als auch für die Behandlung bereits bestehender Infektionen und daraus resultierender Tumore interessant, da die über MHC-Moleküle der Klasse I-präsentierten E7-Peptide von Tumorzellen Zielmoleküle von zytotoxischen T-Zellen darstellen würden.

Einem Impfstoff bestehend aus CVLPs liegt das Prinzip der Pseudoinfektion der Zellen durch die CVLPs zugrunde. Dies bedeutet, daß die CVLPs wie Viren in die Zelle gelangen, dort zu Peptiden prozessiert werden, die Peptide dann auf MHC-Klasse I und II-Moleküle geladen werden und letztendlich CD8- bzw. CD4-positiven T-Zellen präsentiert werden. CD8-Zellen können als Folge dieser Stimulation zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren und dann eine zelluläre Immunantwort bewirken, CD4-Zellen hingegen entwickeln sich zu T-Helferzellen und stimulieren B-Zellen zu einer humoralen oder CD8-positive T-Zellen zu einer zytotoxischen Immunantwort und können selbst die Lyse von infizierten Zellen induzieren.

Kleine Peptide können bereits auf der Zelloberfläche an MHC-Klasse I-Moleküle binden und dann ohne weitere Prozessierung CD8- oder CD4-positive Zellen zu einer zellulären Immunantwort stimulieren. Ein bestimmtes Peptid kann jedoch nur durch bestimmte MHC-Moleküle gebunden werden. Durch den großen Polymorphismus der MHC-Moleküle in natürlichen Populationen kann deshalb ein bestimmtes Peptid lediglich durch einen kleinen Teil einer Population gebunden und präsentiert werden. Unter Präsentation im Sinne der vorliegenden Erfindung wird verstanden, wenn ein Peptid oder Proteinfragment an ein MHC-Molekül bindet, wobei diese Bindung beispielsweise im endoplasmatischen Retikulum, im extrazellulären Raum, den Endosomen, Proendosomen, Lysosomen oder Protysosomen, stattfinden kann, und wenn dann dieser MHC-Molekül-Peptid-Komplex auf der extrazellulären Seite der Zellmembran gebunden ist, so daß er durch Immunzellen spezifisch erkannt werden kann.

Da CVLPs sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort auslösen und nicht MHC-restringiert sind, eignet sich diese Technologie generell zur Entwicklung von Impfstoffen,

indem die Fähigkeit zur Partikelbildung durch einen L1-Anteil, zur Verfügung gestellt wird und ein zusätzlicher Antigenanteil an diesen L1-Anteil fusioniert wird.

Bei der Entwicklung derartiger CVLPs ist es unbedingt notwendig, ein funktionelles Testsystem zur Verfügung zu haben, mit dem man direkt die Immunogenität von CVLPs untersuchen kann. Ein derartiges Testsystem sollte die Eigenschaft besitzen, daß CVLPs mit unterschiedlichen Antigenanteilen mit demselben Testsystem untersucht werden können. Da für immunologische Therapieverfahren von Tumoren oder Viruserkrankungen die zelluläre Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist, stellte sich die Aufgabe, die durch CVLPs hervorgerufene zelluläre Immunantwort meßbar zu machen.

Die Lösung dieser Aufgabe gelang durch die Identifikation von T-Zell-Epitopen, die in Verbindung mit MHC-Molekülen, in einer besonderen Ausführungsform mit HLA A2.01 MHC-Molekülen in vivo und in vitro beispielsweise eine zytotoxische T-Zellantwort auslösen. Diese Peptide haben vorzugsweise die Sequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV. Diese Sequenzen sind Bestandteil des L1-Peptid des HPV16. Sie umfassen die Aminosäurebereiche 86-94 (5104), 123-131 (5106), 285-293 (5107), 275-283 (5108), 238-246 (5109), 426-434 (5112), 28-39 (2016), 311-320 (2017), 408-417 (2018), 38-47 (2019), 396-404 (2020), 349-357 (2022) die Namen der jeweiligen Epitope ist in Klammern angegeben.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, und/oder eine funktionell aktive Variante davon.

Unter einer funktionell aktiven Variante von ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL oder ICWGNQLFV versteht man ein T-Zell-Epitop, das in einem T-Zell-Zytotoxizitäts-Testsystem (siehe beispielsweise Beispiele 2-5 der vorliegenden Erfindung) eine, an der Zytotoxizität von ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL oder ICWGNQLFV

gemessene Zytotoxizität besitzt, die mindestens der Summe aus dem Mittelwert der Negativkontrollen und der dreifachen Standardabweichung entspricht, vorzugsweise von mindestens ca. 30%, insbesondere mindestens ca. 50% und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 80%.

5

Eine bevorzugte Variante ist beispielsweise ein T-Zell-Epitop mit einer Sequenzhomologie zu ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL oder ICWGNQLFV von mindestens ca. 65%, vorzugsweise mindestens ca. 75% und insbesondere mindestens ca. 85% auf Aminosäureebene. Andere bevorzugte Varianten sind auch T-Zell-Epitope, die eine strukturelle Homologie zu ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL oder ICWGNQLFV haben. Solche Epitope können aufgefunden werden, indem man gegen die T-Zell-Epitope ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL oder ICWGNQLFV spezifische T-Zellen generiert (DeBruijn M.L. et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21, 2963-70; und DeBruijn M.L. (1992) Eur. J. Immunol. 22, 3013-20) und beispielsweise synthetisch hergestellte Peptide nach Wahl auf Erkennung durch die peptidspezifischen T-Zellen getestet werden (siehe Beispiele). Insbesondere werden unter T-Zellepitopen zytotoxische T-Zellepitope verstanden. Es sind jedoch auch nicht zytotoxische T-Zellen bekannt, die ebenfalls MHC I-Moleküle erkennen können, so daß auch nicht-zytotoxische T-Zellepitope als Variante von der vorliegenden Erfindung umfaßt sind.

Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein T-Zell-Epitop, das Teil einer Verbindung ist, wobei die Verbindung kein natürlich vorkommendes L1 Protein eines Papillomavirus und keine ausschließlich N-terminale oder ausschließlich C-terminale Deletionsmutante eines natürlich vorkommenden L1 Proteins eines Papillomavirus ist.

30

In einer besonderen Ausführungsform kann ein T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, und/oder eine funktionell aktive Variante in einem L1-Protein eines anderen Papillomavirus oder in einem chimären L1-Protein, beispielsweise einem

HPV18L1E7-Fusionsprotein, enthalten sein. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.

Vorzugsweise kann das genannte T-Zell-Epitop als Teil einer Verbindung ein Polypeptid, das in bevorzugter Weise weitere Aminosäuresequenzen enthält, insbesondere ein Fusionsprotein sein. Insbesondere kann die Verbindung ein Polypeptid von mindestens ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 9-12 Aminosäuren Länge sein.

Um die Verbindung zu detektieren oder in ihrer Aktivität der Bindung an T-Zellen zu modifizieren, kann sie eine chemische, radioaktive Isotopen-, nicht radioaktive Isotopen-, und/oder Fluoreszenzmarkierung des T-Zell-Epitops und/oder des genannten Fusionsproteins enthalten.

Beispiele von dem Fachmann bekannten chemischen Substanzen, die sich für eine erfindungsgemäße chemische Markierung eignen, sind: Biotin, FITC (Fluorescein-isothiocyanat) oder Streptavidin.

Eine mögliche Ausführungsform ist, daß ein Peptid derart modifiziert wird, daß es mindestens ein Lysin enthält. An dieses Lysin wird in der dem Fachmann bekannter Weise Biotin oder FITC (Fluorescein-isothiocyanat) gekoppelt. Ein derartig modifiziertes Peptid wird an ein entsprechendes MHC-Molekül oder an eine Zelle mit entsprechenden MHC-Molekülen gebunden. Daraufhin kann das Peptid über markiertes Avidin oder Streptavidin bzw. direkt über die Fluoreszenz des FITC nachgewiesen werden.

Beispiele von dem Fachmann bekannten Isotopen, die sich für eine erfindungsgemäße radioaktive Isotopenmarkierung eignen, sind: ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P oder ^{14}C .

Beispiele von dem Fachmann bekannten Isotopen, die sich für eine erfindungsgemäße nicht radioaktive Isotopenmarkierung eignen, sind: ^2H oder ^{13}C .

Beispiele von dem Fachmann bekannten fluoreszierenden Substanzen, die sich für eine erfindungsgemäße Fluoreszenzmarkierung eignen, sind: ^{152}Eu , Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phtaldehyd oder Fluorescamin.

- 5 Dem Fachmann sind weitere hier nicht aufgeführte Markierung bekannt, die auch im Sinne dieser Erfindung zur Markierung eingesetzt werden können.

Beispiele von dem Fachmann bekannten erfindungsgemäßen chemischen Modifikationen sind die Übertragung von Acetyl-, Phosphat-, und/oder Monosacharidgruppen

10

Erfindungsgemäße Polypeptide mit einer Aminosäurelänge von ca. 50 können beispielsweise durch eine chemische Peptidsynthese hergestellt werden. Längere Polypeptide werden vorzugsweise gentechnisch erzeugt. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Nukleinsäurekonstrukt zur Expression des genannten T-Zell-Epitops oder der Verbindungen, das folgende Komponenten enthält: (a) mindestens ein regulatorisches Element und (b) mindestens eine Nukleinsäure, die für eine Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Verbindung kodiert. Das genannte Nukleinsäurekonstrukt ist vorzugsweise aus DNA oder RNA. Geeignete regulatorische Elemente erlauben beispielsweise die konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder

15 Verbindungen, das folgende Komponenten enthält: (a) mindestens ein regulatorisches Element und (b) mindestens eine Nukleinsäure, die für eine Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Verbindung kodiert. Das genannte Nukleinsäurekonstrukt ist vorzugsweise aus DNA oder RNA. Geeignete regulatorische Elemente erlauben beispielsweise die konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder

20 metabolischspezifische Expression in eukaryotischen Zellen oder die konstitutive, metabolischspezifische oder regulierbare Expression in prokaryotischen Zellen. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer, und/oder Repressorsequenzen.

Beispiele für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryoten ermöglichen sind Promotoren die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, wie CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40 Promotor und virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV HTLV oder HIV.

30

Beispiele für regulierbare Elemente, die regulierbare Expression in Eukaryoten ermöglichen sind der Tetrazyklinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).

Beispiele für regulierbare Elemente, die gewebsspezifische Expression in Eukaryoten ermöglichen sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden.

- 5 Beispiele für regulierbare Elemente, die zellzyklusspezifische Expression in Eukaryoten ermöglichen sind die Promotoren der folgenden Gene: cdc25C, Cyclin A, Cyclin E, cdc2, E2F, B-myb oder DHFR (Zwicker J. und Müller R. (1997) Trends Genet. 13, 3-6).

- 10 Beispiele für regulierbare Elemente, die metabolisch spezifische Expression in Eukaryoten ermöglichen sind Promotoren, die durch Hypoxie, durch Glucosemangel, durch Phosphatkonzentration oder durch Hitzeschock reguliert werden.

- 15 Um die Einführung der genannten Nukleinsäure und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryotischen Zelle durch Transfektion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen, oder nicht viralen Vektors vorliegen. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb ein Vektor, insbesondere ein Expressionsvektor, der eine Nukleinsäure codierend für ein erfindungsgemäßes Polypeptid enthält. Als virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Baculoviren, Vakziniaviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht
- 20 virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder Poly-Lysin konjugierte DNA.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mindestens ein T-Zell-Epitop enthält, vorzugsweise präsentiert. In einer besonderen Ausführungsform wird die Zelle durch einen der genannten Vektoren transfiziert, transformiert oder infiziert. Diese Zelle exprimiert unter dem Fachmann bekannten Bedingungen, die zur Aktivierung der jeweils verwendeten regulierbaren Elemente führen, das erfindungsgemäße Polypeptid. Das Polypeptid kann dann aus dieser Zelle isoliert und z.B. unter Verwendung einer der oben
- 30 genannten Markierungen aufgereinigt werden. Zur gentechnischen Herstellung und anschließenden Aufreinigung der exprimierten, erfindungsgemäßen Verbindungen eignen sich prokaryotische und eukaryotische Zellen, insbesondere Bakterienzellen wie beispielsweise E. coli, Hefezellen wie beispielsweise S. cerevisiae, Insekten Zellen wie beispielsweise Spodoptera frugiperda Zellen (Sf-9) oder Trichoplusia ni Zellen oder Säugerzellen wie beispielsweise COS-Zellen oder HeLa-Zellen.



Eine bevorzugte Ausführungsform ist es, die Zelle, die das erfindungsgemäße Polypeptide exprimiert, selbst zu verwenden, wobei in einer besonders bevorzugten Ausführungsform die Zelle Teile des erfindungsgemäßen Polypeptids über MHC-I Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert. Für die Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle sind Antigen-präsentierende Zellen wie beispielsweise B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, Fibroblasten oder anderen HLA A2.01 positive Zellen, in einer bevorzugten Ausführungsform JY-, T2, CaSki-Zellen oder EBV-transformierte B-Zelllinien, geeignet. Die erfindungsgemäßen Zellen, die ein Polypeptid enthaltend ein T-Zell-Epitop, präsentieren, können als Zielzellen zur Restimulation von Immunzellen, insbesondere T-Zellen und/oder zur Messung der Aktivierung von T-Zellen eingesetzt werden. Unter Zielzelle im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle zu verstehen, die über MHC-Moleküle ein T-Zell-Epitope präsentiert und damit spezifisch eine T-Zell-Aktivierung hervorruft, insbesondere eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen die Zelle.

Ferner kann die ein T-Zell-Epitop enthaltene Verbindung, Teil eines Komplexes sein, der dadurch charakterisiert ist, daß die Verbindung kovalent oder über hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindung oder Wasserstoffbrückenbindungen mit mindestens einer weiteren Spezies wie Peptide, Proteine, Peptoide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysaccharide und Nukleinsäuren verbunden ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop oder eine Verbindung und mindestens eine weitere Verbindung. Eine bevorzugte Ausführungsform ist, daß das Polypeptid in Verbindung mit MHC Klasse I-Molekülen, vorzugsweise als HLA A2.01 Tetramer vorliegt. Besonders bevorzugt sind humane MHC-Klasse I Moleküle. Durch die Technik von Altman J.D. et al. (1996, Science 274, 94-6) lassen sich beispielsweise HLA A2.01-Tetramere mit den entsprechenden gebundenen Peptiden herstellen, die in der Lage sind, an die T-Zellrezeptoren von peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen zu binden.

Eine weitere Ausführungsform ist die Immobilisierung der erfindungsgemäßen Verbindung oder des genannten Komplexes an Trägermaterialien. Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline

Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose oder Gerüstproteine.

Zur Aufreinigung des erfindungsgemäßen Komplexes kann eine Komponente des Komplexes zusätzlich noch ein Protein-Tag enthalten. Erfindungsgemäße Protein-Tags erlauben beispielsweise die hochaffine Absorption an eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern ohne den Komplex im nennenswerten Maße zu eluieren und anschließende gezielte Elution des absorbierten Komplexes. Beispiele von dem Fachmann bekannten Protein-Tags, sind ein (HIS)₆-Tag, ein Myc-Tag, ein FLAG-Tag, ein Hämagglutinin-Tag, Glutathion-Transferase (GST)-Tag, Intein mit einem Affinitäts- Chitin-binding Tag oder Maltose binding protein (MBP)-Tag. Die erfindungsgemäßen Protein-Tags können sich N-, C-terminal, und/oder intern befinden.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen durch mindestens eine Verbindung, enthaltend ein T-Zell-Epitop. Ein derartiges Verfahren besteht vorzugsweise aus drei Schritten:

- a) In einem ersten Schritt werden Zellen mit mindestens einer Verbindungen enthaltend ein T-Zell-Epitop stimuliert. Diese Verbindung kann mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens ein Capsomer, mindestens ein stabiles Capsomer, mindestens ein VLP, mindestens ein CVLP, und/oder mindestens ein Virus bedeuten. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Immunzellen durch die Inkubation mit CVLPs stimuliert. Diese Stimulation kann beispielsweise in Form einer Impfung erfolgen, oder durch Inkubation von Immunzellen mit CVLPs in vitro. Derartig stimulierte Immunzellen werden beispielsweise nach einer Impfung oder bei einem Tumorpatienten aus dem Blut, aus Tumoren oder aus Lymphknoten gewonnen, und/oder werden kultiviert.
- b) In einem zweiten Schritt werden Zellen mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert und/oder mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex inkubiert.
- c) In einem dritten Schritt erfolgt die Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen. Hierfür geeignete Verfahren sind beispielsweise der Nachweis der Produktion oder Sekretion

von Cytokinen durch die T-Zellen, der Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen, der Lyse von Zielzellen oder der Proliferation von Zellen. Hierfür geeignete Methoden sind beispielsweise ein Cytokinassay (Chapter 6.2 bis 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W., John Wiley & Sons), ELISPOT (Chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology, supra), ein ^{51}Cr -Freisetzungstest (Chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology, supra) oder der Nachweis der Proliferation (Chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology, supra). Je nach verwendeter Methode kann dabei auch zwischen den Immunzellen wie zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen, B-Zellen, NK-Zellen und anderen Zellen unterschieden werden. Die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen, Komplexen, und/oder Zellen, die erfindungsgemäße Markierungen enthalten, erlaubt die Detektion von T-Zellen, die das T-Zell-Epitop erkennen über den Nachweis der Bindung markierter Verbindungen, Komplexe, und/oder Zellen an die T-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung erfindungsgemäßer MHC-Polypeptid-Komplexe an die Oberfläche der T-Zellen nachgewiesen. Dies kann derart durchgeführt werden, daß die MHC-Komplexe selbst markiert, beispielsweise fluoreszenzmarkiert sind, oder daß man in einem weiteren Schritt einen MHC-spezifischen, markierten, beispielsweise fluoreszenzmarkierten Antikörper verwendet, um wiederum die MHC-Komplexe nachzuweisen. Die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen läßt sich dann beispielsweise in einem 'Fluorescens Activated Cell Sorter' (FACS) messen und auswerten. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Bindung von den Komplexen an die T-Zellen ist erneut die Messung der Aktivierung von T-Zellen (Cytokinassay, Elispot, ^{51}Cr -Freisetzungstest, Proliferation, siehe oben). Allerdings benötigt man hierfür die gleichzeitige Stimulation von Korezeptoren (z. B. CD28), beispielsweise durch Korezeptor-spezifische Antikörper (Anti-CD28) und/oder andere unspezifische Aktivatoren (IL-2).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, das einen zusätzlichen Schritt

a') enthält, der nach Schritt a) eingeführt wird.

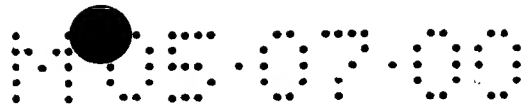
a') In diesem zusätzlichen dem Schritt a) nachfolgenden Schritt a') werden die isolierten oder kultivierten Zellen mit mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem

Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP und/oder mindestens einem Virus, mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert, für mindestens ca. 8 Wochen, insbesondere für mindestens ca. 1 Woche kokultiviert, bevor sich Schritt b) anschließt.

Unter Kokultivierung ist das Wachstum der Zellen:

- (i) in Gegenwart von mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
- (ii) in Gegenwart mindestens eines erfindungsgemäßen Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop,
- (iii) in Gegenwart mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert, im selben Wachstumsmedium und selben Gewebekulturbedeälter zu verstehen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer T-Zell-Epitop präsentierenden Zielzelle. Hierbei ist es möglich, die Zielzelle mit Kombinationen von unterschiedlichen T-Zell-Epitopen zu beladen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit mindestens einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop und/oder mindestens einem Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop inkubiert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle in Wachstumsmedium, das erfindungsgemäße Polypeptide enthält, oder mit MHC Klasse I-Komplexen mit gebundenen erfindungsgemäßen Polypeptiden inkubiert. Die MHC Klasse I-Komplexe können beispielsweise als HLA A2.01-Tetramere vorliegen. Ein Tetramer bindet dabei in der Regel vier Peptide. Diese können sowohl identisch sein oder aber unterschiedliche Spezies von Peptiden repräsentieren. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit einer Nukleinsäure und/oder einem Vektor transfiziert, transformiert und/oder infiziert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit einem Vakziniavirusvektor infiziert. Das erfindungsgemäße Verfahren wird mit Antigen-präsentierenden Zellen beispielsweise mit B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, embryonalen Zellen oder Fibroblasten oder anderen HLA A2.01 positiven Zellen, in einer bevorzugten Ausführungsform mit JY-, T2-, CaSki- Zellen oder EBV-transformierten B-Zelllinien durchgeführt.



Die verwendeten CVLPs enthalten ein Papillomavirus L1-Protein oder Varianten davon, insbesondere HPV16 L1-Protein und, jedoch nicht notwendigerweise, ein zu L1 heterologes Protein oder Varianten davon. Die zwei Proteine können direkt oder indirekt gebunden vorliegen. Direkt gebunden meint im Sinne der Erfindung, daß eine kovalente Bindung zwischen den beiden Proteinen vorliegt, beispielsweise eine Peptidbindung oder eine Disulfidbindung. Indirekt gebunden bedeutet, daß die Proteine über nicht-kovalente Bindungen gebunden sind, beispielsweise hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindungen oder Wasserstoffbrücken. In einer weiteren Ausführungsform enthalten die CVLPs zusätzlich zu L1-Protein oder Varianten davon ein Papillomavirus L2-Protein.

Eine bevorzugte Ausführung des L1-Proteins der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise L1-Proteine mit einer oder mehreren Deletionen, insbesondere einer C-terminalen Deletion. Eine C-terminale Deletion hat den Vorteil, daß die Effizienz der Bildung virus-ähnlicher Partikel gesteigert werden kann, da das am C-Terminus lokalisierte nukleäre Lokalisationssignal deletiert wird. Die C-terminale Deletion beträgt daher vorzugsweise bis zu ca. 35 Aminosäuren, insbesondere ca. 25 bis ca. 35 Aminosäuren, vor allem ca. 32 bis ca. 34 Aminosäuren. Beispielsweise ist eine 32 Aminosäuren lange C-terminale Deletion des HPV16 L1-Proteins ausreichend, um die Bildung von virus-ähnlichen Partikeln um das mindestens ca. zehnfache steigern zu können. Des weiteren kann das L1-Protein eine oder mehrere Mutationen tragen oder der L1-Anteil aus L1-Proteinen verschiedener Papillomaviren zusammengesetzt sein. Gemeinsames Kennzeichen der erfindungsgemäßen L1-Proteine ist, daß sie die Bildung von VLPs bzw. CVLPs zulassen und daß sie mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das L1-Protein oder Varianten davon und das zu L1 heterologe Protein ein Fusionsprotein. Beinhaltet sind auch heterologe Proteine, die aus mehreren verschiedenen Proteinen oder Teilen davon zusammengesetzt sind. Dies können beispielsweise auch Epitope, insbesondere zytotoxische T-Zellepitope von Proteinen sein. Epitope im Sinne der Erfindung können dabei auch Teil eines synthetischen Polypeptids mit einer Länge von ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 9 Aminosäuren sein.

Bevorzugt sind zu L1 heterologe Proteine, die von einem viralen Protein abgeleitet sind, beispielsweise abgeleitet von HIV, HBV oder HCV, vorzugsweise von Papillomaviren, insbesondere von humanen Papillomaviren.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform ist dies ein E-Protein eines Papillomavirus, vorzugsweise ein E6- und/oder E7-Protein. Insbesondere ist bevorzugt, wenn das E-Protein ein deletiertes E-Protein ist, vorzugsweise ein C-terminal deletiertes, insbesondere ein C-terminal deletiertes E7-Protein, da diese Konstrukte in Verbindung mit deletiertem L1-Protein bevorzugt virus-ähnliche Partikel ausbilden können. Insbesondere bevorzugt sind Deletionen
10 bis zu 55 Aminosäuren, vorzugsweise ca. 5 bis ca. 55 Aminosäuren, insbesondere ca. 38 bis ca. 55 Aminosäuren.

In einer weiteren Ausführung kann das zu L1 heterologe Protein von Antigenen nicht viraler Erreger abstammen. Ebenso können sie von Autoimmunantigenen wie z.B. Thyroglobulin,
15 Myelin basic protein oder Zona Pellucida Glycoprotein 3 (ZP₃), die mit bestimmten Autoimmunkrankheiten wie z.B. Thyroiditis, Multiple Sklerose, Oophoritis oder rheumatoider Arthritis assoziiert sind, abgeleitet sein. In einer bevorzugten Ausführung stammt das zu L1 heterologe Protein von Tumorantigenen ab, vorzugsweise Melanomaantigenen wie MART, Ovarialcarcinomantigenen wie Her2 neu (c-erbB2), BCRA-1 oder CA125,
20 Colonicarcinomantigenen wie CA125 oder Mammacarcinomantigenen wie Her2 neu (c-erbB2), BCRA-1, BCRA-2.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist ein Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen, die durch Präparation aus Proben gewonnen werden. Dieses Verfahren erlaubt es zu bestimmen, ob in einer Probe, beispielsweise einer Blutprobe eines Patienten oder in Tumoren oder Lymphknoten eines Tumorpatienten, Papillomavirus L1-Protein-spezifische zytotoxische T-Zellen vorhanden sind. Ein derartiges Nachweisverfahren enthält die folgenden Schritte:

a“) In einem ersten Schritt werden Zellen gewonnen, beispielsweise durch Blutabnahme
30 von einem Patienten oder durch die Präparation zum Beispiel von Tumoren oder Lymphknoten. Anschließend werden die Zellen in Wachstumsmedium aufgenommen und kultiviert.

- b) In einem zweiten Schritt werden Zellen mit mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert oder mit mindestens einem Komplex, der als eine Komponente eine Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitope umfaßt, inkubiert.
- c) In einem dritten Schritt erfolgt die Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen. Hierfür geeignete Verfahren sind beispielsweise der Nachweis der Produktion oder Sekretion von Cytokinen durch die T-Zellen, der Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen, der Lyse von Zielzellen oder der Proliferation von Zellen. Hierfür geeignete Methoden sind beispielsweise ein Cytokinassay (Chapter 6.2 bis 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W., John Wiley & Sons), ELISPOT (Chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology, supra), ein ^{51}Cr -Freisetzungstest (Chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology, supra) oder der Nachweis der Proliferation (Chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology, supra). Je nach verwendeter Methode kann dabei auch zwischen den Immunzellen wie zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen, B-Zellen, NK-Zellen und anderen Zellen unterschieden werden. Die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen, Komplexen, und/oder Zellen die erfindungsgemäße Markierungen enthalten erlaubt die Detektion von T-Zellen, die das T-Zell-Epitop erkennen über den Nachweis der Bindung markierter Verbindungen, Komplexe, und/oder Zellen an die T-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung erfindungsgemäßer MHC-Polypeptid-Komplexe an die Oberfläche der T-Zellen nachgewiesen. Dies kann derart durchgeführt werden, daß die MHC-Komplexe selbst markiert, beispielsweise fluoreszenzmarkiert sind, oder daß man in einem weiteren Schritt einen MHC-spezifischen, markierten, beispielsweise fluoreszenzmarkierten Antikörper verwendet, um wiederum die MHC-Komplexe nachzuweisen. Die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen läßt sich dann beispielsweise in einem 'Fluorescens Activated Cell Sorter' (FACS) messen und auswerten. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Bindung von den Komplexen an die T-Zellen ist erneut die Messung der Aktivierung von T-Zellen (Cytokinassay, Elispot, ^{51}Cr -Freisetzungstest, Proliferation, siehe oben). Allerdings benötigt man hierfür die gleichzeitige Stimulation von Korezeptoren (z. B. CD28), beispielsweise durch Korezeptor-spezifische Antikörper (Anti-CD28) und/oder andere unspezifische Aktivatoren (IL-2).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, das einen zusätzlichen Schritt a') enthält, der nach Schritt a'') eingeführt wird.

a') In diesem zusätzlichen dem Schritt a'') nachfolgenden Schritt a') werden die isolierten oder kultivierten Zellen mit mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP und/oder mindestens einem Virus, mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert, für mindestens ca. 8 Wochen, insbesondere für mindestens ca. 1 Woche kokultiviert, bevor sich Schritt b) anschließt.

Unter Kokultivierung ist das Wachstum der Zellen:

- (i) in Gegenwart von mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
- (ii) in Gegenwart mindestens eines erfindungsgemäßen Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop,
- (iii) in Gegenwart mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert, im selben Wachstumsmedium und selben Gewebekulturbedeälter zu verstehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testsystem (Kit) zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthaltend:

- a) mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop, mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung, mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor, mindestens eine erfindungsgemäße Zelle, und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex, und
- b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.

Das Testsystem wird in einer besonderen Ausführungsform zur Bestimmung der, beispielsweise in einer Blutprobe eines Patienten oder in Tumoren oder Lymphknoten eines Tumorpriienten vorhandenen L1-Protein-spezifischen zytotoxischen T-Zellen verwendet. In

diesem Fall sind die in b) beschriebenen Zellen im Testsystem enthaltene Kontrollzellen, deren Aktivierung durch die erste Kitkomponente, die unter a) genannten Substanzen, als Standard dient. Die in dieser Reaktion beobachteten Aktivierung wird mit die T-Zell-Aktivierung von aus Patienten isolierten Zellen durch die Kitkomponente a) verglichen.

5

In einer weiteren besonderen Ausführungsform wird das Testsystem beispielsweise zur Bestimmung der L1-Protein-spezifischen Antigenität einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, eines Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop, eines Capsomers, eines stabilen Capsomers, eines VLPs, eines CVLPs, und/oder eines Virus verwendet. In diesem Fall sind die in a) beschriebenen Substanzen Kontrollsubstanzen deren aktivierende Wirkung auf die zweite Kitkomponente, die unter b) genannten Zellen, als Standard dient. Die in dieser Reaktion beobachteten Aktivierung wird mit der aktivierenden Wirkung einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, einem Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, einem Capsomer, einem stabilen Capsomer, einem VLP, ein CVLP, und/oder einem Virus auf die Kitkomponente b) verglichen.

10

15

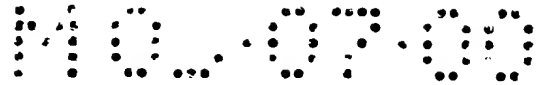
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von mindestens einem T-Zell-Epitop, mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Vektor enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für eine ein T-Zell-Epitop enthaltende Verbindung, mindestens einer erfindungsgemäßen Zelle enthaltend ein T-Zell-Epitop zur, und/oder mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop zur Auslösung oder zum Nachweis einer Immunantwort.

20

Zur Stimulation von Immunzellen in vitro wie in vivo eignen sich insbesondere Zellen, die mindestens eines der erfindungsgemäßen Moleküle über ihre MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren. Zur Antigen-Präsentation geeignete Zellen sind z. B. B-Zellen, dendritische Zellen, Macrophagen, Fibroblasten oder andere HLA A2.01 positive Zellen, die durch eine gemeinsame Kultivierung mit Immunzellen eine Stimulation von spezifischen T-Zellen erreichen können.

30

In einer besonderen Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Verbindung beispielsweise ein HPV18 L1E7-Fusionsprotein, das zusätzlich ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthält, zur Detektion einer Immunantwort eingesetzt werden. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.



Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einen Vektor enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für eine ein T-Zell-Epitop enthaltende Verbindung, mindestens eine erfindungsgemäße Zelle enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop und gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

Beispiele von dem Fachmann bekannten Trägern sind Glas, Polystyren, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon, Amylase, natürliche oder modifizierte Zellulose, Polyacrylamide, Agarose, Aluminiumhydroxid oder Magnitid.

Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel oder Diagnostikum kann in Lösung vorliegen, an eine feste Matrix gebunden sein, und/oder mit einem Adjuvans versetzt sein.

Das Arzneimittel oder Diagnostikum kann auf verschiedene Weisen verabreicht werden. Beispiele von dem Fachmann bekannten Verabreichungsformen sind parenterale, lokale und/oder systemische Applikation durch z. B. orale, intranasale, intravenöse, intramuskuläre, und/oder topische Applikation. Die bevorzugte Applikationsform wird beispielsweise durch den natürlichen Infektionsweg der jeweiligen Papillomavirusinfektion beeinflusst. Die verabreichte Menge richtet sich nach Alter, Gewicht, allgemeinem Gesundheitszustand des Patienten und dem Typ der Papillomavirusinfektion. Das Arzneimittel oder Diagnostikum kann in Form von Kapseln, Lösung, Suspension, Elixier (für orale Applikation) oder sterile Lösungen bzw. Suspensionen (für parenterale oder intranasale Applikation) verabreicht werden. Als inerter und immunologisch akzeptabler Träger kann beispielsweise Salzlösung oder phosphatgepufferte Salzlösung verwendet werden. Das Arzneimittel wird in therapeutisch effektiven Mengen verabreicht. Das bedeutet Mengen, die ausreichend sind, um eine schützende immunologische Antwort hervorzurufen.

In einer besonderen Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Verbindung beispielsweise ein HPV18 L1E7-Fusionsprotein, das zusätzlich ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthält, als Arzneimittel oder Diagnostikum eingesetzt werden. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.

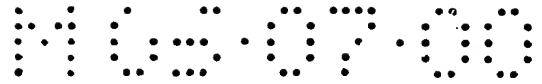


Die Figuren und die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

Fig. 1 zeigt die graphische Auswertung der MTT-Färbung von WEHI-Zellysaten, gemessen
 5 als Absorption bei 595 nm, die mit Überständen von T-Zellen inkubiert worden waren, die
 wiederum durch unterschiedliche Antigen-präsentierende periphere Blutlymphozyten (PBL)
 stimuliert worden waren. Durch spezifische Antigen-präsentierende PBL stimulierte T-Zellen
 sekretieren TNF_α . Dieses induziert bei WEHI-Zellen Apoptose, so daß diese Zellen MTT
 10 nicht mehr zu einem bräunlichen Farbstoff prozessieren können. Niedrige Absorption
 bedeutet geringe Farbstoffproduktion und somit viele apoptotische Zellen, die somit viel
 TNF_α ausgesetzt waren, so daß die zugehörigen T-Zellen stimuliert worden waren. Somit ist
 die Stimulation der T-Zellen umso besser, je niedriger die Absorption für ein bestimmtes
 Antigen bei 595 nm ist.

Fig. 2 zeigt die graphische Auswertung der Fluoreszenz von T2-Zellen – gemessen in einer
 15 FACS-Analyse -, deren auf der Zelloberfläche befindliche MHC-1 Moleküle durch einen
 FITC-markierten Antikörper markiert worden waren. Zellen, deren MHC-1 Moleküle
 spezifisch die auf der X-Achse aufgetragenen Peptide binden können, haben vermehrt MHC-1
 Moleküle, da die spezifische Bindung die MHC-Komplexe stabilisiert, so daß sie sich auf der
 20 Zelloberfläche anreichern können.

Fig. 3 zeigt die Auswertung von drei FACScan-Experimenten nach Restimulation CVLP-
 spezifischer humaner T-Zellen mit peripheren Blutmononukleären Zellen (PBMC), die
 unterschiedliche Antigene präsentieren. Von links nach rechts ist jeweils der Gehalt an CD3
 aufgetragen, das für T-Zellen spezifisch ist, und von unten nach oben der Gehalt an humanem
 Interferon γ , das für aktivierte Zellen spezifisch ist.



Beispiele

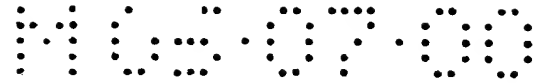
1. Beschreibung der Ausgangsmaterialien

- Die Herstellung von HPV16 L1_{ΔC}•E7₁₋₅₅ CVLPs erfolgte gemäß der deutschen Patentanmeldung DE 198 12 941, siehe auch Müller M. et al. (1997) Virology 234, 93-111.
- Die Herstellung von L 1 VLP's erfolgte gemäß Müller M. et al. (1997) Virology 234, 93-111.
- T2 Zellen, die unter der ATCC Nummer: CRL-1992 zu beziehen sind, weisen einen Defekt im Antigenprozessierungs-assoziierten Transport auf, der zur Unterbindung der Beladung von MHC-1 Molekülen im endoplasmatischen Retikulum führt. Die dennoch auf der Zelloberfläche vorhandenen unbeladenen MHC-1 Moleküle können beispielsweise durch Inkubation der Zellen in Peptid-haltigen Medien beladen werden, so daß sich diese Zellen sehr gut zur Präsentation eines Antigens eignen.
- WEHI Zellen sind unter der ATCC Nummer CRL-2148 zu beziehen.
- PMBC bedeutet periphere Blutmononukleäre Zellen, deren Isolierung wird beispielsweise in Rudolf M.P. et al. (1999), Biol. Chem. 380, 335-40 beschrieben.
- BB7.2 bedeute ein α -HLA A2.01-spezifischer monoklonaler Maus Antikörper (ATCC HB-82).
- α -hum CD28 bedeutet ein monoklonaler Maus-Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil von humanem CD28 gerichtet ist.
- α -hum CD3/PE bedeutet ein monoklonaler Maus Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil von humanem CD3 (ϵ) gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker Phycoerithrin enthält (Medac, Hamburg, Deutschland).
- α -hum CD4/Cychrome bedeutet ein monoklonaler Maus-Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil von humanen CD4 gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker Cychrome enthält (DAKO; Glostrup, Dänemark).
- α -hum Interferon γ /FITC bedeutet einen monoklonaler Ratten-Antikörper, der gegen humanes Interferon γ gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker FITC enthält (Medac, Hamburg, Deutschland).
- InfluenzaMP bedeutet Aminosäuren 58-66 GILGFVFTL des Influenza Matrix Protein (siehe Dunbar P.R. et al. (1998) Curr. Biol. 26, 413-6).
- HPV16E7-Peptid bedeutet Aminosäuren 11-20 YMLDLQPETT des humanen Papillomavirus E7-Proteins.

- Die verwendeten Peptide, die in den nachfolgenden Beispielen verwendet wurden, sind von der HPV16 L1-Sequenz abgeleitet, die Aminosäurepositionen des jeweiligen Fragments ist relativ zum Met (+1), der unter Genbank Zugangsnummer: g333037 hinterlegten Sequenz, angegebenen:

	Peptid Name	Sequence	rel. L1-Position
5	5104	ILVPKVSG	(86-94)
	5105	SMDYKQTQL	(174-182)
	5106	RLVWACVGV	(123-131)
	5107	HLFNRAQTV	(285-293)
10	5108	YLRREQMFV	(275-283)
	5109	TLQANKSEV	(238-246)
	5112	ILEDWNFGL	(426-434)
	5113	TLEDTYRFV	(441-449)
	2016	SLWLPSEATVYL	(28-39)
15	2017	NLASSNYFPT	(311-320)
	2018	TLTADVMTYI	(408-417)
	2019	YLPPVPVSKV	(38-47)
	2020	YDLQFIFQL	(396-404)
	2021	FQLCKITLT	(402-410)
20	2022	ICWGNQLFV	(349-357)
	2023	KVVSTDEYV	(46-54)
	2024	QLFVTVVDT	(354-362)
	2025	GLQYRVFRI	(93-101)

- Golgi Plug ist durch Pharmingen (Hamburg, Deutschland) erhältlich.
- IL-2 wurde von Becton Dickinson (Hamburg, Deutschland) bezogen.
- MTT-Lösung in PBS bedeutet 2,5 mg/ml 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in PBS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).
- PBS bedeutet „phosphate buffered saline“ und besteht aus 16,6 mM Na_2HPO_4 8,4 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl pH 7,4.
- Zellen wurden jeweils bei 37°C und 5% CO_2 in RPMI-Medium (Gibco BRL, Eggenstein; Deutschland) mit 10% fötalem Kälberserum, Kanamycin und Ampicillin kultiviert.
- FACScan calibur bedeutet 'fluorescens activated cell sorter' die Apparatur wurde von Becton Dickenson (Hamburg, Deutschland) bezogen.
- Cellquest Software wurde von Becton Dickinson (Hamburg, Deutschland) bezogen.



2. Peptid-spezifische TNF_α -Sekretion durch CVLP-stimulierte T-Zellen

5 a) Herstellung CVLP-spezifischer T-Zellen

Humane T-Zellen (4×10^5) wurden für 8 Wochen mit HPV16 $\text{L1}_{\Delta\text{C}}\cdot\text{E7}_{1-55}$ CVLPs bei 37°C unter wöchentlicher Zugabe von $1 \mu\text{g/ml}$ CVLPs, 10^5 bestrahlten periphere Blutmononukleäre Zellen (PMBC) und 10 IU/ml IL-2 stimuliert und geerntet.

10 b) Stimulation mit Antigenen

Die Zellen wurden über Nacht in $100 \mu\text{l}$ Medium bei 37°C mit unterschiedlichen Antigenen (PMBC + E7-Peptid; PMBC + HPV16 $\text{L1}_{\Delta\text{C}}\cdot\text{E7}_{1-55}$ (CVLP); PMBC + 5104, 5105, 5106, 5107, 5108, 5109, 5112, 5113 je $10 \mu\text{g/ml}$) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL-2 stimuliert. Während dieser Zeit produzieren stimulierte Zellen TNF_α .

15

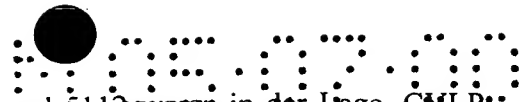
c) TNF_α -Nachweis

Am nächsten Tag wurden $50 \mu\text{l}$ Überstand entnommen, eingefroren, wieder aufgetaut (um evtl. mitgenommene Zellen abzutöten) und zu $50 \mu\text{l}$ einer Zellsuspension gegeben, die $0,9 \times 10^6$ WEHI-Zellen, $2 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D und 400 mM LiCl enthielt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit leitet TNF_α (sofern im Überstand enthalten) Apoptose der WEHI-Zellen ein. Durch Zugabe von $50 \mu\text{l}$ einer $2,5 \text{ mg/ml}$ MTT-Lösung in PBS wurden innerhalb von 3 Stunden nicht apoptotische Zellen braun angefärbt, apoptotische Zellen hingegen blieben gelb. Sämtliche Zellen wurden durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ Lysis-Puffer (34% N,N dimethylformamide, 20% sodium dodecyl sulfate) und eine Inkubation für mindestens 6 Stunden bei 37° lysiert, so daß die Farbstoffe freigesetzt wurden. Abschließend wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen.

25

Fig. 1 zeigt die unterschiedlichen Antigene aufgetragen gegen die gemessene Absorption bei 595 nm . Niedrige Absorption bedeutet geringe Farbstoffproduktion und somit viele apoptotische Zellen, die somit viel TNF_α ausgesetzt waren, so daß die zugehörigen T-Zellen stimuliert worden waren. Somit war die Stimulation der T-Zellen umso besser, je niedriger die Absorption bei 595 nm ist.

30



Ergebnis: Die Peptide 5104, 5106, 5107, 5108, 5109 und 5112 waren in der Lage, CVLP-spezifische T-Zellen zu stimulieren.

5 3. Bindung von Peptiden an T2-Zellen

a) Beladung der T2-Zellen

2,5x 10⁶ T2-Zellen wurden in Medium enthaltend 2% humanes Serum über Nacht in Anwesenheit von 0, 10 oder 100 µg/ml 5105, 5106, 5107, 5109, 5112, 5113, InfluenzaMP, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025 Peptid-bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit können passende Peptide an die unphysiologisch leeren MHC-1 Moleküle binden und diese somit stabilisieren, wohingegen MHC-1 Moleküle ohne passende Peptide relativ schnell wieder in die Zelle aufgenommen werden. Somit erhöhen spezifisch bindende Peptide die Anzahl der MHC-1 Moleküle auf der Zelloberfläche.

b) Nachweis der Peptidbindung an MHC-1 Komplexe der T2-Zellen

Am nächsten Morgen wurden die Zellen geerntet, mit PBS enthaltend 0,5% bovines Serumalbumin (BSA) gewaschen und die MHC-1 Moleküle nachgewiesen. Dies erfolgt durch die Inkubation für 30 min auf Eis mit dem Antikörper BB7.2, Waschen und Färbung mit einem α-Maus FITC-Antikörper für weitere 30 min auf Eis. Die Zellen wurden erneut gewaschen, in einem FACScan calibur gemessen und mit Cellquest Software analysiert.

Fig. 2 zeigt die verschiedenen Peptide aufgetragen gegen die gemessene Fluoreszenz.

Ergebnis: T2-Zellen nach Inkubation mit den L1-Peptiden 5106, 5107, 5109, 5112, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020 und 2022 zeigen wie nach Inkubation mit dem bekannten Influenza-Peptid MP deutlich mehr MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche, was auf eine Bindung der entsprechenden Peptide an die MHC-Moleküle hindeutet.



4. Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

Humane T-Zellen (4×10^5) wurden für 8 Wochen mit HPV16 L1_{ΔC}-E7₁₋₅₅ CVLPs bei 37°C unter wöchentlicher Zugabe von 1 µg/ml CVLPs sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (bestrahlte PMBC) stimuliert und geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit 10 µg/ml verschiedener Antigene in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 und 0,5 µg/ml α-human CD28 restimuliert:

- a) über Nacht mit CVLP-inkubierten PBMC
- b) über Nacht mit L1 2022-Peptid inkubierten PBMC
- c) über Nacht mit L1 2025-Peptid (Kontroll-Peptid) inkubierten PBMC

Nach einer Stunde wurde 1 µl Golgi Plug zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α-hum CD3/PE, mit α-hum CD4/Cychrome und mit α-hum Interferon γ/FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

Ergebnis: Fig. 3 zeigt, daß die CVLP-inkubierten PBMC wie auch die mit dem L1-Peptid 2022-inkubierten PBMC eine Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen bewirkten, nicht aber die mit dem Kontroll-Peptid inkubierten PBMC.

Patentansprüche

5

1. T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, und/oder eine funktionell aktive Variante davon.

10

2. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Variante eine Sequenzhomologie zu ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL oder ICWGNQLFV von mindestens ca. 65%, vorzugsweise mindestens ca. 75% und insbesondere mindestens ca. 85% auf Aminosäureebene besitzt.

15

3. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Variante eine strukturelle Homologie zu ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL oder ICWGNQLFV hat.

20

4. T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß das T-Zell-Epitop ein zytotoxisches T-Zell-Epitop ist.

5. Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verbindung kein natürlich vorkommendes L1 Protein eines Papillomavirus und keine ausschließliche N-terminale oder ausschließliche C-terminale Deletionsmutante eines natürlich vorkommenden L1 Proteins eines Papillomavirus ist.

30

6. Verbindung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid, insbesondere ein Fusionsprotein ist.

7. Verbindung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid von mindestens ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35

35



Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 9-13 Aminosäuren Länge ist.

- 5 8. Verbindung nach einem der Ansprüche 5-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung eine chemische, radioaktive, nicht radioaktive Isotopen und/oder Fluoreszenzmarkierung des T-Zell-Epitops und/oder des genannten Fusionsproteins, und/oder eine chemische Modifikation des T-Zell-Epitops und/oder Fusionsproteins enthält.
- 10 9. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein T-Zell-Epitop oder eine Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8 kodiert.
- 15 10. Vektor, insbesondere ein Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 enthält.
11. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8 enthält, vorzugsweise präsentiert.
- 20 12. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch 10 transfiziert, transformiert, und/oder infiziert ist.
13. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wurde.
- 30 14. Zelle nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine dendritische Zelle, ein Fibroblast, insbesondere eine JY-, T2-, CaSki-Zelle oder EBV-transformierte Zelle ist.
15. Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 oder eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und mindestens eine weitere Verbindung.

4:05:07:00

16. Komplex nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex mindestens ein MHC-Klasse I-Molekül, vorzugsweise als HLA A2.01 Tetramer enthält.

5 17. Komplex nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte MHC-Klasse I Molekül ein humanes MHC-Klasse I Molekül, insbesondere ein HLA A2.01 Molekül ist.

10 18. Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen durch mindestens eine Verbindung, enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, das folgende Schritte enthält:

- a) Stimulation von Zellen mit mindestens einer genannten Verbindung;
- b) Zugabe von mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert oder eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 15-17, und
- c) Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen.

15 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es nach Schritt a) folgenden zusätzlichen Schritt a') enthält:

20 a') Cokultivierung der Zellen für mindestens ca. 1 Woche, insbesondere mindestens ca. 8 Wochen mit:

- (i) mindestens einer Zielzelle beladen mit einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
 - (ii) mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17,
 - (iii) und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert,
- 30 bevor sich Schritt b) anschließt.

20. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11, 13, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle mit mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens einem Komplex gemäß einem



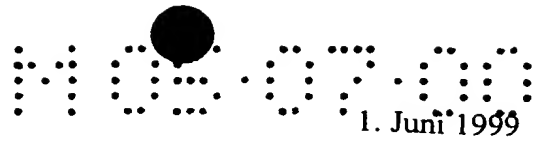
der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wird.

21. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11, 12, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzellen mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch 10 transfiziert, transformiert und/oder infiziert wird.
22. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine dendritische Zelle, ein Fibroblast, insbesondere eine JY-, T2-, CaSki-Zelle oder EBV-transformierte Zelle ist.
23. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß anstelle von Schritt a) folgender Schritt a'') durchgeführt wird:
a'') Gewinnung und Präparation von Proben enthaltend T-Zellen und anschließende Kultivierung.
24. Testsystem zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthaltend:
a) mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, und
b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.
25. Verwendung mindestens eines T-Zell-Epitops gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens eines Vektors gemäß Anspruch 10, mindestens einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 15-17 zur Auslösung oder zum Nachweis einer Immunantwort.
26. Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine



Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

- 5 27. Arzneimittel oder Diagnostikum nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens ein Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens ein Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 in Lösung vorliegt, an eine feste Matrix gebunden ist, und/oder mit einem Adjuvans versetzt ist.



M 29314 BÖ/ZW/ts

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Papillomavirus T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz ILVPKVSGL, RLVWACVGV, HLFNRAGTV, YLRREQMFV, TLQANKSEV, ILEDWNFGL, SLWLPSEATVYL, NLASSNYFPT, TLTADVMTYI, YLPPVPVSKV, YDLQFIFQL, ICWGNQLFV, und/oder eine funktionell aktive Variante

10 davon, sowie ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie.

M 05.07.00

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5 (i) ANMELDER:

- (A) NAME: MediGene AG
- (B) STRASSE: Lochhamer Str. 11
- (C) ORT: Planegg, Martinsried
- (D) BUNDESLAND:
- 10 (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 82152

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Zytotoxische T-Zellepitope des Papillomavirus L1-Proteins und ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie

15 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 20

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Word 6.0

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9
- (B) ART: Aminosäure
- 30 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus
- (B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1

40 Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly Leu 9

1

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9
- (B) ART: Aminosäure
- 50 (D) TOPOLOGIE: linear

14.09.07.00

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4

Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe Val 9

1

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

15

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5

Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val 9

1

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6

Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu 9

1

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

50

H 05.07.00

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

10

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7

15

Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu 12
 1 11

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

30

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8

Asn Leu Ala Ser Ser Asn Tyr Phe Pro Thr 10

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

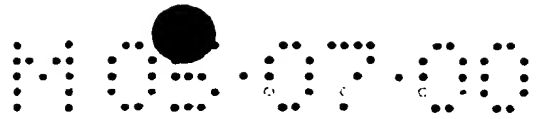
45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

50



(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9

Thr Leu Thr Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile 10

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10

(B) ART: Aminosäure

15 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

20 (A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10

Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser Lys Val 10

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

40 (A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11

Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu 9

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12

05.07.00

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12

Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val 9

1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Influenzavirus

(B) Typ A

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu 9

1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

No. 07.00

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

5

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14

10 Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr 10

1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

25

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15

30

Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu 9

1

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

40

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

45

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

105.07.00

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16

5 Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val 9

1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

20

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17

25

Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr 9

1

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

35

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

40

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18

No. 07.00

Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val 9
1

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9

(B) ART: Aminosäure

10 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

15 (A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19

Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr 9
1

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9

30 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humaner Papillomavirus

(B) Typ 16

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

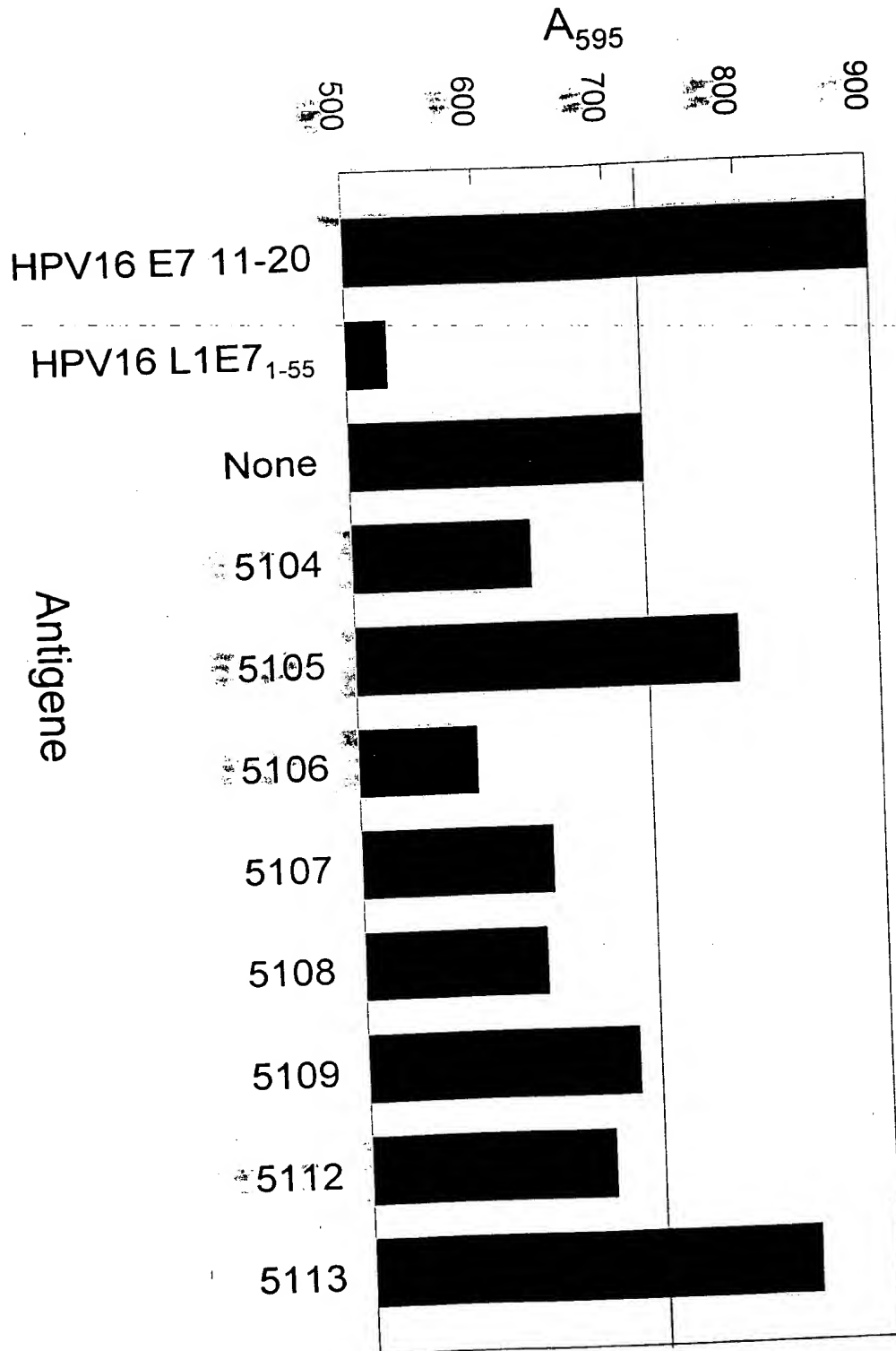
40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20

Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile 9
1

105-07-00

Fig. 1



14.07.00

Fig. 2

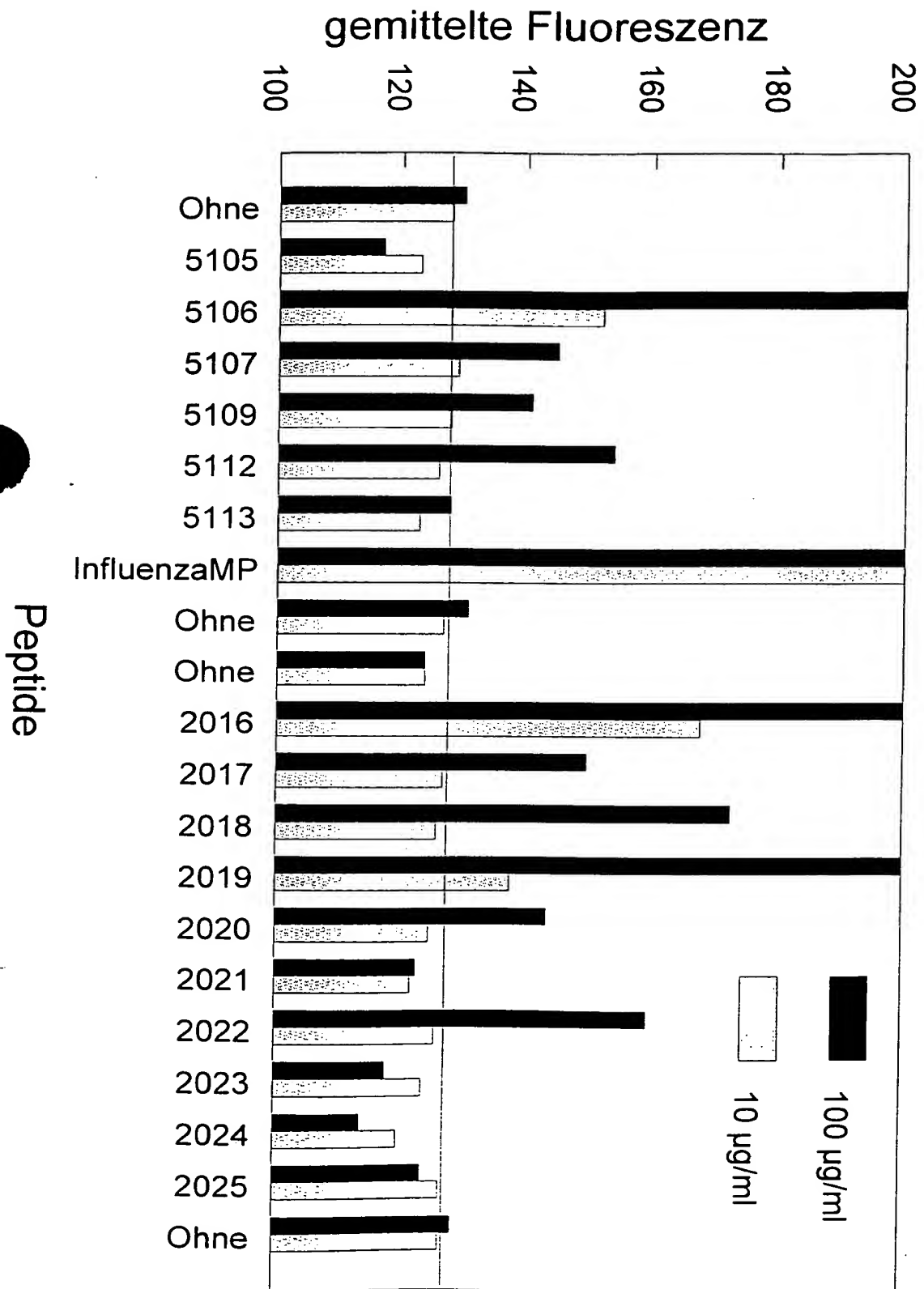


Fig. 3

